N° 42. **H. A. Hosbach, A. H. Egg** und **E. Kubli.** — Einfluss der Futterzusammensetzung auf Verdauungsenzym-Aktivitäten bei *Drosophila melanogaster*-Larven [1]. (Mit 7 Textabbildungen)

Zoologisch-Vergl. Anatomisches Institut der Universität Zürich.

1. Einleitung

Beim Studium entwicklungsbiologischer Probleme sind Letalfaktoren ein wertvolles Hilfsmittel (Hadorn, 1956; Chen, 1971). Seit einigen Jahren wird an unserem Institut der rezessive Letalfaktor *l(2)me* von *Drosophila melanogaster* intensiv biochemisch untersucht. Die homozygoten Tiere sind charakterisiert durch einen Entwicklungsstillstand im 3. Larvenstadium (Schmid, 1949). Fütterungsversuche zeigten, dass 4-tägige Hungerlarven der Mutante Kasein nicht verdauen können (Chen und Hadorn, 1955). Misst man die Protease-, Trypsin-, Leucinaminopeptidase- und Carboxypeptidase-Aktivitäten in Mitteldärmen, so ergibt sich eine gesicherte Reduktion gegenüber dem Wildtyp (Waldner-Stiefelmeier, 1967). Studien über die Inkorporation von radioaktiven Aminosäuren in die Darmproteine von *l(2)me*- und +/+- Larven ergaben keinen Aufschluss darüber, ob die Proteasesynthese bei *l(2)me* gegenüber anderen Darmproteinen reduziert ist (Kubli, 1970). Es ist bis heute nicht bekannt, ob diese Effekte bei *l(2)me* eine primäre oder sekundäre Schädigung des Organismus darstellen. Die Mutation scheint allerdings nach den vorliegenden Ergebnissen in die Regulation der Verdauungsenzyme einzugreifen und nicht eine spezifische Protease zu schädigen. Um genaue Aussagen über den Angriffspunkt machen zu können, ist eine bessere Kenntnis der Verhältnisse beim Wildtyp unerlässlich. Da über den Einfluss des Futters auf die Regulation der Aktivität von Darmenzymen auch bei normalen Larven keine Resultate vorliegen, stellten wir uns folgende Fragen:

— Genügt die Darmfüllung für eine Erhöhung der Enzymaktivitäten des Darmes?

— Beeinflusst die Futterzusammensetzung die Aktivität bestimmter Darmenzyme?

— Ist die Aktivität eines bestimmten Darmenzyms dem Anteil seines Substrates im Futter proportional?

---

[1] Ausgeführt und herausgegeben mit Unterstützung durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung und die Georges und Antoine Claraz-Schenkung.

Für die Untersuchung der oben erwähnten Probleme wurden die Protease- und die Amylase-Aktivitäten in Abhängigkeit von verschiedenen Fütterungsbedingungen bestimmt.

2. Material und Methode

a. *Versuchstiere und Zuchtmethoden*

Einstündige Gelege des Wildstammes „Sevelen" von *Drosophila melanogaster* wurden auf Standardfutter (Mais-Zucker-Agar-Hefe) bei 25° C aufgezogen. Das Alter der Larven wird in Stunden nach der Eiablage angegeben.

b. *Messung der Proteaseaktivität*

Zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität verwendeten wir das Verfahren nach Charney und Tomarelli (1947). Das Prinzip dieser Methode besteht in einer enzymatischen Verdauung von Azoproteinen, was zur Bildung von gefärbten Produkten führt. Deren Farbintensität ist eine Funktion der Proteaseaktivität der Enzymlösung. Es wurde nach dem in Figur 1 abgebildeten Schema verfahren. Als Referenz diente ein Kontrollansatz ohne Enzym.

Nach Charney und Tomarelli befolgt die enzymatische Verdauung von Azoproteinen die Gleichung für eine monomolekulare Reaktion. Die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion kann als Mass für die Enzymaktivität gelten:

$$K = \frac{1}{t} \cdot 2{,}3 \cdot \log \frac{c_1}{c_2}$$

wobei: t = Inkubationszeit in Minuten
c_1 = Anfangskonzentration des Substrats
c_2 = Endkonzentration des Substrats

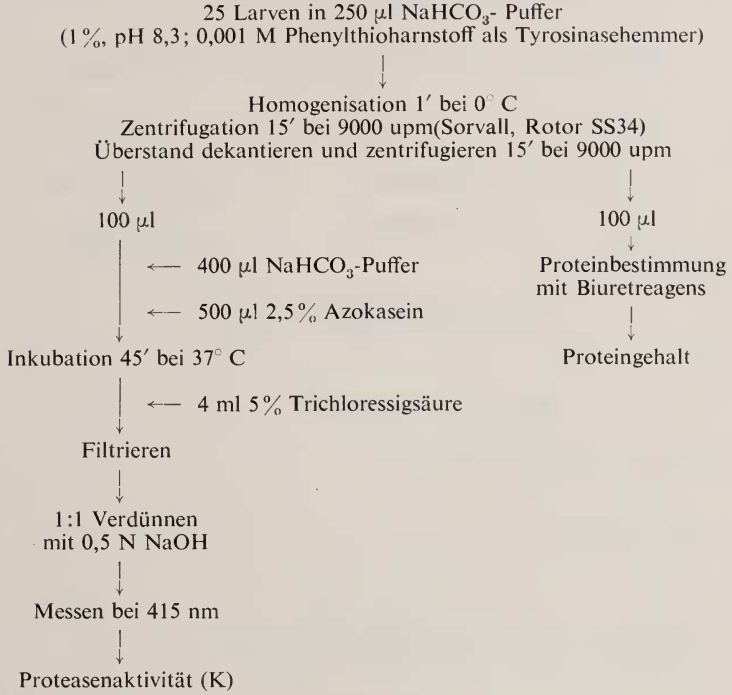
c_1 wird erhalten, indem man die Farbe misst von 3 ml 1:10 verdünnter Substratlösung, die mit 3 ml 0,5 N NaOH versetzt wurde. c_2 ergibt sich als Differenz zwischen c_1 und der optischen Dichte des Trichloressigsäure-Filtrates nach der Verdauung. Als Bezugsgrösse wurde die Gesamtproteinkonzentration des Enzymansatzes gewählt. Für die proteolytische Aktivität ergibt sich:

$$A = K/\mu g \text{ Protein}$$

Die Proteinmessung erfolgte mit dem Biuretreagens bei 550 nm (Gornall et al., 1949). Für die Proteineichkurve wurde Rinderalbumin als Vergleichssubstanz genommen.

FIG. 1.

Schema zur Messung der Proteaseaktivität.



c. *Messung der Amylaseaktivität*

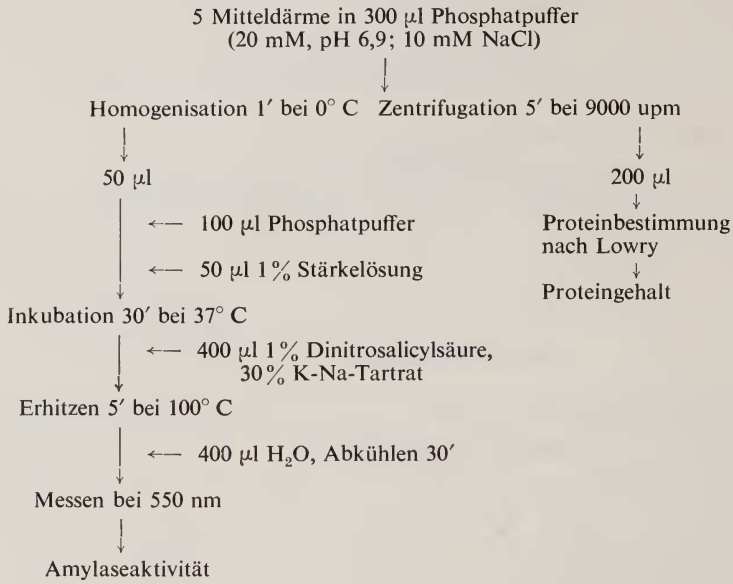
Stärke wird durch α-Amylase zu Bruchstücken hydrolysiert (reduzierende Zucker, z. Bsp. Maltose), deren reduzierende Hemiacetalgruppen mit Dinitrosalicylsäure bestimmt werden können. Die Konzentration der entstandenen Nitroaminosalicylsäure wurde photometrisch gemessen; sie entspricht der Konzentration der neugebildeten Endgruppen und damit direkt der Enzymaktivität (DOANE, 1969; BERGMEYER, 1970; ISHAAYA und SWIRSKI, 1970).

Für die Bestimmung der Amylase-Aktivität wurde nach dem in Figur 2 angegebenen Schema verfahren.

Die Amylaseaktivitäten werden heute allgemein in µM Maltose pro Minute Inkubation angegeben. Mit Hilfe einer Maltose-Eichkurve (0,1 mM Maltoselösung) wurden die gemessenen Absorptionen auf Maltose-Konzentrationen umgerechnet. Da wir unsere Werte auf den Proteingehalt des Enzymextrakts bezogen haben, ergibt sich als Einheit µ mole Maltose/min/µg Protein.

FIG. 2.

Schema zur Messung der Amylaseaktivität.



3. RESULTATE

a. *Kaseinfütterung*

Für unsere Versuche verwendeten wir 72 h-Larven, da diese eine hoh Proteaseaktivität aufweisen (WALDNER-STIEFELMEIER, 1967).

Proteasemessungen von Mitteldärmen, ganzen Larven, der Hämolymphe un des Restkörpers zeigten, dass der Hauptanteil der Proteasen im Mitteldar lokalisiert ist (Tab. 1). Der geringe Anteil der Hämolymphe und des Restkörpe an der Gesamt-Protease-Aktivität erlaubt ohne weiteres ein Arbeiten mit ganze Larven. Die Beobachtung, dass Mitteldarmhomogenate eine grössere protec

TABELLE 1

Proteaseaktivitäten verschiedener Drosophilagewebe. Die Werte stellen Mittel aus mehrere Messungen dar. Für die Homogenate wurden jeweils 25 Tiere verwendet.

	Därme	Larven	Hämolymphe	Restkörper
72 +/+ Larven	K = 309,57	285,92	46,05	9,95
Nach 5 h Hunger	231,13	184,77	41,67	—
Prozentuale Abnahme	26%	28%	10%	—

lytische Aktivität als Ganztierhomogenate aufweisen, lässt sich durch Inhibitorwirkungen erklären (ENGELMANN und WILKENS, 1969).

In einer Reihe von Versuchen wurde das Verhalten der Proteaseaktivität verfolgt, nachdem 72 h-Larven in den Hungerzustand übergeführt worden waren.

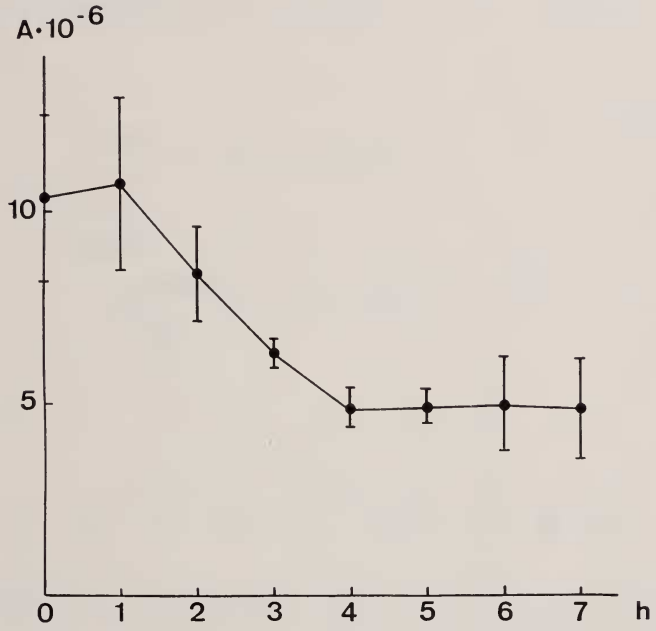


FIG. 3.

Abnahme der Proteaseaktivität bei hungernden 72 h +/+ Larven.
A = spezifische Aktivität, ist mit dem Faktor ½ zu multiplizieren

Dazu wurden Larven aus den Zuchtflaschen herausgewaschen und während den nächsten 7 h in Petrischalen auf mit Insektenringer-Lösung befeuchtetem Filterpapier gehalten. Die Messung der Proteaseaktivität erfolgte stündlich. Die Abnahme der Aktivität während des Hungerns geht in 3 Phasen vor sich (Fig. 3). Bis zu einer merklichen Reduktion verstreichen etwa 1 bis 1½ Stunden. Diese Verzögerung erklärt sich möglicherweise dadurch, dass es etwa 2—2½ Stunden dauert, bis der Darm von der proteinhaltigen Nahrung durchlaufen ist (SCHMID, 1949). Manchmal wurden in dieser Phase auch zunehmende Aktivitäten gemessen. Diese beruhen nicht auf einem verkleinerten Proteingehalt, sondern auf einer erhöhten Azokaseinmessung (die spezifische Aktivität wird durch Quotientenbildung mit dem Proteingehalt erhalten). Die erste Phase wird von einer Periode rapider Aktivitätsabnahme gefolgt. Die Absorptionen nehmen etwa um 50% des Ausgangswertes ab. Eine stabile „Hungeraktivität" stellt sich etwa 4 Stunden

nach Hungerbeginn ein. Sie bleibt während den nächsten 7 Stunden konstant.

Nach Überführung der Hungerlarven in Kasein (mit Insektenringer-Lösung im Volumenverhältnis 1:1 gemischt) konnte ein Ansteigen der proteolytischen Aktivität beobachtet werden (Fig. 4). Im Vergleich zu den Hungerlarven bewegten

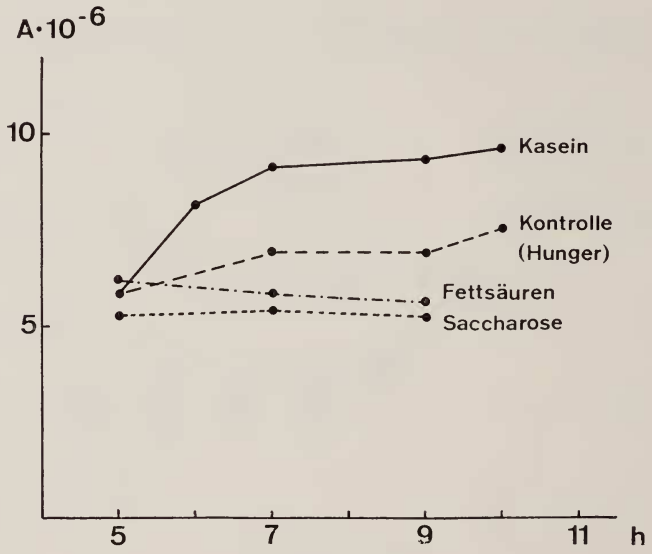


Fig. 4.

Einfluss von Kasein-, Saccharose- und Fettsäure-Fütterung auf die Protease-Aktivität nach 5 h Hunger (+/+, 72 h, A = spezifische Aktivität, ist mit dem Faktor ½ zu multiplizieren).

sich die Zunahmen der Aktivitäten nach Kaseinfütterung zwischen 40 und 70%. Fütterung mit Saccharose oder mit Fettsäuren hat keine Zunahme der proteolytischen Aktivität zur Folge. Die Werte blieben vielmehr denjenigen der Hungerlarven gleich.

b. *Stärke und Saccharosefütterung*

Larven im Alter von 72 h weisen im Mittel eine Amylaseaktivität von $62{,}6 \cdot 10^{-4}$ μ mole Maltose/min/μg Protein auf (Fig. 5). Lässt man Tiere dieses Alters hungern, so sinkt sie in den ersten vier Stunden um 25—35%. Diese Abnahme setzt, anders als bei den Proteasen, ohne anfängliche Verzögerung ein. Nach vier Stunden Hunger bleibt die Aktivität für mindestens vier weitere Stunden praktisch konstant.

Für die Fütterungsversuche wurden die Larven nach 4 Stunden, d.h. nach Erreichen der minimalen Aktivität, in Futter bestimmter Zusammensetzung übertragen. Wurde reine Stärke als Substrat angeboten, so erhöhte sich die Aktivität sofort (Fig. 6). Spätestens nach vier Stunden war die Ausgangsaktivität wieder

erreicht. Mit löslicher Stärke (nach Zulkowsky) wurden die gleichen Resultate wie mit unlöslicher Stärke erzielt.

In weiteren Versuchen wurde den Larven Kaolin (Al-Silikat), Kasein (nach Hammarsten) und Saccharose (reinst) angeboten. Fütterung mit Kaolin ergab

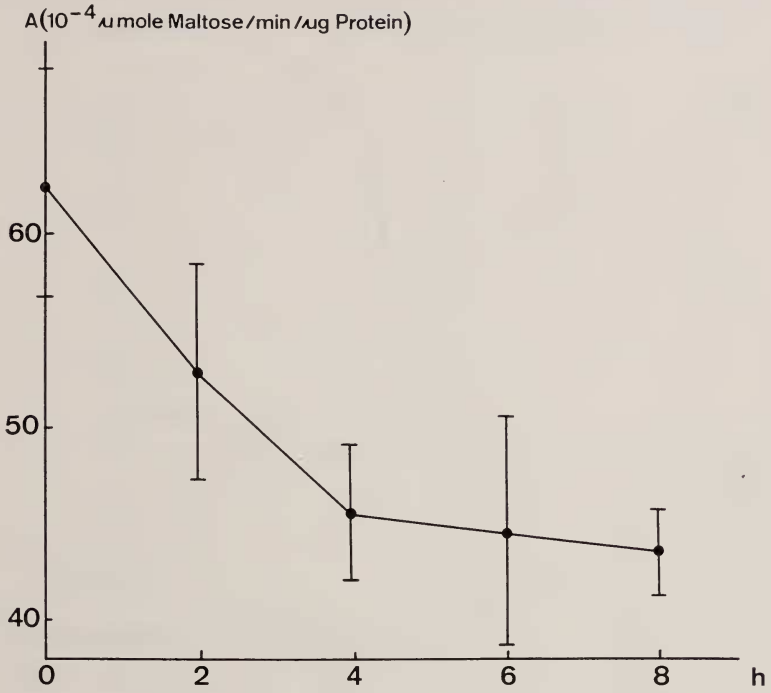


FIG. 5.

Abnahme der Amylaseaktivität bei hungernden 72 h +/+ Larven.

Aktivitäten, die etwas über den Hungerkontrollen lagen (nicht dargestellt). Als Nahrung dürfte Kasein sicher attraktiver sein als Kaolin, trotzdem erhielten wir bei Kaseindiät keine erhöhten Aktivitäten. Hohe Konzentrationen an reduzierenden Zuckern wurde nach Saccharosefütterung festgestellt. Die berechneten Aktivitäten überstiegen $100 \cdot 10^{-4}$ μ mole Maltose/min/μg Protein [1].

c. *Gradientenversuche*

Um Auskunft darüber zu erhalten, ob der Anteil eines bestimmten Substrates im Futter die entsprechende Enzymaktivität beeinflusst, wurden folgende

[1] Eine Wiederholung der Versuche mit einer neuen Saccharoseprobe ergab keinen Anstieg der Amylaseaktivität. Die anfänglich erhaltenen hohen Werte dürften auf einer Verunreinigung der verwendeten Probe beruhen.

Versuche durchgeführt. Verschiedene Mengen von Kasein und Kaolin wurden gemischt und Hungerlarven verfüttert. Nach 3 Stunden wurde die Proteaseaktivität gemessen (Fig. 7). Die resultierenden Aktivitäten zeigten eine lineare Abhängigkeit vom Kaseingehalt. Gleiche Resultate wurden erhalten mit Kasein/Stärke-Gra-

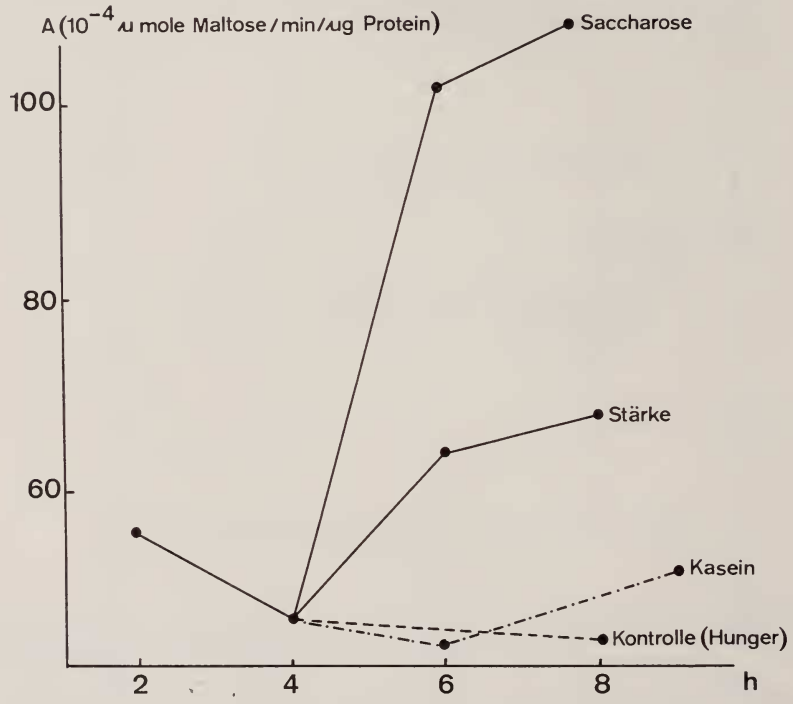


FIG. 6.

Einfluss von Saccharose-, Stärke- und Kasein-Fütterung auf die Amylase-Aktivität nach 4 h Hunger (+/+, 72 h).

dienten. Auch für die Amylase-Aktivität konnte eine direkte Abhängigkeit vom Stärkegehalt der Nahrung nachgewiesen werden.

4. DISKUSSION

Für eine Regulation der Aktivität von Darmenzymen sind verschiedene Mechanismen denkbar: 1. eine unspezifische Sekretion von Enzymen erfolgt auf eine Füllung des Darmes (z. Bsp. Stimulation durch Dehnung desselben), wobei die Zusammensetzung des Futters keine Rolle spielt (DADD, 1961), oder 2. die Zusammensetzung des Futters bestimmt, welche Enzyme aktiviert bzw. synthetisiert werden. In beiden Fällen könnte eine Regulation durch Hormone oder

über eine direkte Stimulierung der Darmzellen durch das Futter stattfinden (sekretagoge Wirkung, ENGELMANN, 1969). Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Darmenzymaktivitäten eine spezifische Antwort auf das gebotene Substrat darstellen. Die maximale Zunahme der Aktivitäten ist bereits nach 2 Stunden erreicht. Ob diese Steigerung auf einer Neusynthese von Enzymen beruht, wie sie von

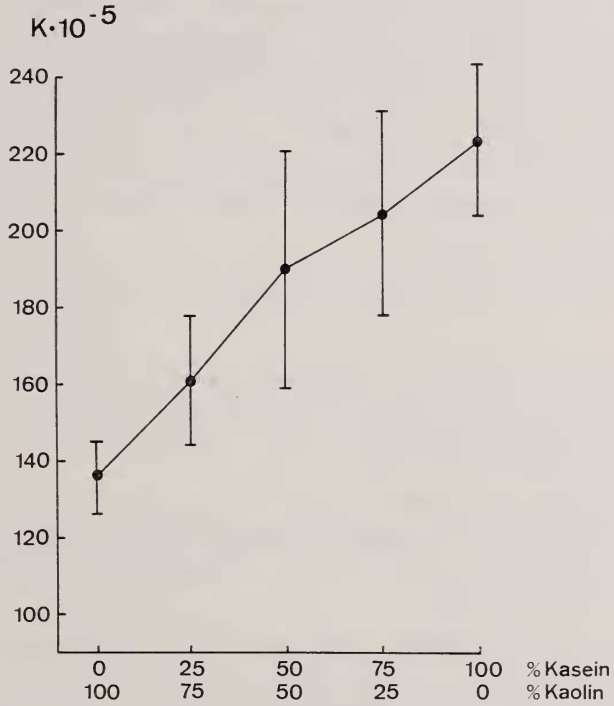


FIG. 7.

Abhängigkeit der Proteaseaktivität vom Kasein/Kaolin-Verhältnis des Futters (+/+, 72 h, 5 h Hunger, 3 h Futter, K = Geschwindigkeitskonstante).

ENGELMANN (1969) für *Leucophaea* wahrscheinlich gemacht werden konnte, ist durch unsere Experimente nicht zu entscheiden. Vielleicht handelt es sich auch um eine Überführung von inaktiven Enzymen in einen aktiven Zustand. Ähnliche Ergebnisse wurden auch durch Verfütterung von Blut an Adultmücken von *Culex pipiens fatigans* erhalten (BRIEGEL, 1969; SPIRO-KERN und CHEN, 1972). Ob die Regulation bei *Drosophila*-Larven direkt oder indirekt (über Hormone) erfolgt, ist nicht bekannt. Die Versuche von ENGELMANN und WILKENS (1969) mit *Sarcophaga bullata* lassen jedoch vermuten, dass auch bei *Drosophila* die Regulierung durch eine direkte, sekretagoge Stimulierung zustandekommt.

Die Ergebnisse der Gradientenversuche legen nahe, dass die Regulation spezifischer Enzyme nicht nach einem Alles-oder-Nichts Prinzip stattfindet. Die Protease- bzw. Amylase-Aktivitäten sind praktisch linear abhängig vom Kasein- bzw. Stärkegehalt des Futters. Den gleichen Befund erhielten auch ENGELMANN und WILKENS (1969) durch Fütterung von Hühnchenleber-Homogenat bei *Sarcophaga bullata*. Unsere Versuche haben allerdings den Nachteil, dass die Menge des aufgenommenen Futters nicht genau gemessen werden konnte.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eindeutig, dass *Drosophila*-Larven selektiv die Darmenzymaktivitäten regulieren können. Dies ist für Larven, die ihre ganze Entwicklungszeit in einem relativ homogenen Futterbrei verbringen, nicht unbedingt zu erwarten. Weitere Versuche sollen zeigen, ob ähnliche Regulationsmechanismen auch für die verschiedenen Aktivitäten einer Enzymklasse gelten (z. Bsp. Trypsin-, Leucinaminopeptidase-, Carboxypeptidase A-Aktivitäten).

ZUSAMMENFASSUNG

1. Der Hauptanteil der Proteasen 72-stündiger Larven von *Drosophila melanogaster* ist im Mitteldarm lokalisiert. Die Amylaseaktivität des Mitteldarmes beträgt 45% der Gesamtaktivität.

2. Durch Hungernlassen konnte für beide Enzyme eine Aktivitätsabnahme festgestellt werden. Bei den Proteasen beträgt die Abnahme nach 4 h Hunger 50%, bei den Amylasen 30%. Während den nachfolgenden 7 Stunden bleiben die Enzymaktivitäten konstant.

3. Durch Fütterung verschiedener Substanzen konnte gezeigt werden, dass die Enzymaktivität substrat-spezifisch reguliert wird.

4. Die Amylase- und die Protease-Aktivität verhält sich proportional zum Stärke- bzw. Proteingehalt der Nahrung.

5. Verschiedene Möglichkeiten der Regulation von Verdauungsenzym-Aktivitäten werden mit den vorliegenden Resultaten verglichen und diskutiert.

RÉSUMÉ

1. La plus grande partie des enzymes protéolytiques de larves de 72 heures de *Drosophila melanogaster* sont localisées dans l'intestin moyen. L'activité amylolytique de l'intestin moyen est de 45% de l'activité totale.

2. En privant les larves de nourriture on constate une diminution de l'activité des deux enzymes. Pour les protéases cette diminution après 4 heures de jeûne

est de 50%, pour les amylases de 30%. Pendant les 7 heures suivantes, les activités enzymatiques restent constantes.

3. L'alimentation avec diverses substances a montré que l'activité enzymatique est réglée par le substrat.

4. L'activité des amylases est proportionnelle à la teneur en fécule, celle des protéases à la teneur en protéine.

5. Différentes théories sur la régulation des enzymes digestives sont discutées et confrontées avec les résultats du présent travail.

Summary

1. Proteolytic enzymes of 72 hours larvae of *Drosophila melanogaster* are mainly located in the midgut. The activity of the amylase of the midgut is 45% of the animal's total activity.

2. During starvation a decrease in activity was registered for both enzymes. Proteolytic activity decreases by 50% after 4 hours of starving, amylolytic activity by 30%. The activities of the enzymes remain constant for the following 7 hours.

3. By feeding with various substances it was shown that the regulation of enzyme activity is substrate-specific.

4. Amylolytic as well as proteolytic activity is proportional to the content of starch or protein, respectively, in the food.

5. Various possibilities concerning the regulation of digestive enzymes are discussed and compared with the present results.

LITERATUR

Bergmeyer, H. U. 1970. *Methoden der enzymatischen Analyse*. Weinheim: Verlag Chemie. Bd. I: 848-857.

Briegel, H. 1969. *Untersuchungen zum Aminosäuren- und Proteinstoffwechsel während der autogenen und anautogenen Eireifung von Culex pipiens*. J. Insect Physiol. 15: 1137-1166.

Charney, J. and R. M. Tomarelli. 1947. *A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice*. J. biol. Chem. 171: 501-505.

Chen, P. S. 1971. *Biochemical Aspects of Insect Development*. Basel: Karger-Verlag.

— und E. Hadorn. 1955. *Zur Stoffwechselphysiologie der Mutante letal-meander (lme) von Drosophila melanogaster*. Rev. suisse Zool. 62: 338-347.

DADD, R. H. 1961. *Evidence of humoral regulation of digestive secretion in the beetle Tenebrio molitor.* J. exp. Biol. 38: 259-266.

DOANE, W. W. 1969. *Amylase variants in Drosophila melanogaster, linkage studies and characterization of enzyme extracts.* J. exp. Zool. 171: 321-341.

ENGELMANN, F. 1969. *Food-stimulated synthesis of intestinal proteolytic enzymes in the cockroach Leucophaea maderae.* J. Insect Physiol. 15: 217-235.

— und J. WILKENS. 1969. *Synthesis of digestive enzymes in the fleshfly Sarcophaga bullata stimulated by food.* Nature 222: 798.

GORNALL, A. G., C. J. BARDAWILL and M. M. DAVID. 1949. *Determination of serum proteins by means of the biuret reaction.* J. biol. Chem. 177: 751-766.

HADORN, E. 1956. *Letalfaktoren.* Stuttgart: Thieme-Verlag.

ISHAAYA, I. and E. SWIRSKI. 1970. *Invertase and amylase activity in the armoured scales Chrysomphalus aonidum and Aonidella aurantii.* J. Insect Physiol. 16: 1599-1606.

KUBLI, E. 1970. *Untersuchungen zum Nukleinsäure- und Protein-Stoffwechsel des Wildtyps und der Letalmutante „l(2)me" von Drosophila melanogaster.* Z. vergl. Physiol. 70: 175-195.

SCHMID, W. 1949. *Analyse der letalen Wirkung des Faktors lme (letal-meander) von Drosophila melanogaster.* Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.- L. 83: 220-253.

SPIRO-KERN, A. und P. S. CHEN. 1972. *Über die Proteasen der Stechmücke Culex pipiens.* Rev. suisse Zool. (im Druck).

WALDNER-STIEFELMEIER, R. 1967. *Untersuchungen über die Proteasen im Wildtyp und in den Letalmutanten (lme und ltr) von Drosophila melanogaster.* Z. vergl. Physiol. 56: 268-289.

N° 43. **N. Hyvert, B. Pelvat** et **G. de Haller.** — Morphogenèse expérimentale chez les Ciliés: IV. Sur le rôle de la Zone de Membranelles Adorales dans la régénération chez *Stentor coeruleus.* (Avec 5 fig.)

Département de Biologie animale, Professeur G. de Haller, Université de Genève.

I. INTRODUCTION

Cette étude porte sur les mécanismes de morphogenèse cellulaire, et plus particulièrement sur la stomatogenèse (formation de l'appareil buccal: zone de membranelles adorales ZMA), chez *Stentor coeruleus*, protozoaire cilié hétérotriche (fig. 1.)